

Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido en cepas de la familia *Enterobacteriaceae*

Extended Spectrum Betalactamase Detection in Enterobacteriaceae Family Strains

**Perozo Mena, Armindo José¹
y Castellano González, Maribel Josefina²**

¹Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia.
Centro de Referencia Bacteriológica. Servicio Autónomo Hospital
Universitario de Maracaibo. E-mail: aperozomena@cantv.net;
aperozomena@interlink.net.ve;

²Escuela de Bioanálisis. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia.
E-mail maribelcast@interlink.net.ve; maribeljo@cantv.net

Resumen

La alta incidencia de las enfermedades infecciosas y el surgimiento de enterobacterias resistentes a los antibióticos representan un gran problema actualmente, siendo las cepas productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido (BLEE) un ejemplo de este fenómeno. A fin de determinar la producción de BLEE en cepas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* aisladas en el Centro de Referencia Bacteriológica del Servicio Autónomo del Hospital Universitario de Maracaibo, durante el periodo enero 2006-diciembre 2007, se analizaron 3883 enterobacterias distribuidas en 14 especies diferentes. Para la detección de BLEE se utilizó como método preliminar el de Kirby-Baüer, siguiendo los lineamientos del CLSI; adicionalmente se utilizaron pruebas confirmatorias como sinergia del doble disco, el método del disco combinado y el método de E-Test ESBL. Del total de enterobacterias estudiadas 951 (24,49%) fueron productoras de BLEE. *K. oxytoca* (43,33%), *K. pneumoniae* (40,10%), y *Enterobacter cloacae* (31,54%), fueron los microorganismos con mayor producción de BLEE. Al correlacionar la producción de BLEE con el servicio de atención del paciente, se encontró asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre la producción de BLEE y las UCI. Estos resultados reflejan el uso excesivo de antibióticos, lo que trae como consecuencia la aparición y diseminación de la resistencia.

Palabras clave: Enterobacterias, Betalactamasas de Espectro Extendido, Resistencia, BLEE.

Recibido: 20-11-08 / Aceptado: 06-05-09

Abstract

The high incidence of infectious diseases and the rise of antibiotic-resistant enterobacteria represent a great medical problem today, and the Extended Spectrum Betalactamase (ESBL)-producing strains are an example of this phenomenon. In order to determine the production of ESBL in strains pertaining to the Enterobacteria family, isolated in the Bacteriological Reference Center at Maracaibo's University Hospital from January 2006-December 2007, 3883 strains of enterobacteria were analyzed, distributed among 14 different species. To detect ESBL, the Kirby-Bauer test was used as a preliminary method, following the CLSI guidelines; additionally, confirmatory tests such as double disc synergy, the combined disc and E-test ESBL methods were used. Of all the enterobacteria studied, 951 (24.49%) were ESBL producers. *K. oxytoca* (43.33%), *K. pneumoniae* (40.10%), and *Enterobacter cloacae* (31.54%) were the microorganisms with greater ESBL production. When correlating ESBL production with the patient services, a statistically significant association ($p < 0.05$) between ESBL production and the ICU was detected. These results reflect that excessive antibiotic use produces the appearance and dissemination of resistance.

Key words: *Enterobacteriaceae*, Extended Spectrum Betalactamase, Resistance, ESBL.

Introducción

La alta incidencia de las enfermedades infecciosas causadas principalmente por enterobacterias, así como, el surgimiento de cepas resistentes y multiresistentes a los antibióticos, son elementos que constituyen uno de los mayores problemas de la medicina actual y futura, ya que estos factores dificultan el tratamiento de las enfermedades infecciosas y deterioran la calidad de vida del individuo.

Entre los antimicrobianos más ampliamente utilizados se encuentran los betalactámicos. Se clasifican en relación a su estructura nuclear común: el anillo Betalactámico que posee similitud estructural con los sitios de unión de los substratos bacterianos, lo que le permite unirse e inactivar las transpeptidasas, carboxipeptidasas y endopeptidasas necesarias para la síntesis del peptidoglucano de la pared celular. Entre estos se encuentran: la penicilina, las cefalosporinas, los carbapenémicos y los monobactámicos, los cuales continúan siendo objeto de modificacio-

nes bioquímicas dirigidas a modular su actividad antimicrobiana (1).

A pesar de que los antibióticos betalactámicos fueron muy eficaces cuando se comenzaron a utilizar, años después de la salida al mercado de la penicilina, se presentaron los primeros casos de resistencia al antibiótico por algunas bacterias que hidrolizaban el anillo betalactámico, a través de la producción de enzimas denominadas betalactamasas (1), estas enzimas han evolucionado a lo largo del tiempo por lo que en la actualidad encontramos un gran número de enzimas distribuidas en una gran variedad de microorganismos de diferentes géneros y especies.

Las Betalactamasas son el principal mecanismo de resistencia bacteriana a los antibióticos betalactámicos. Estas son enzimas catalíticas de naturaleza proteica cuya producción está controlada por un gen, bien sea cromosómico o transferido por plásmidos o transposones, actúan rompiendo el enlace amídico del anillo betalactámico, previa unión al grupo carboxilo, lo que provoca que el antibiótico pierda la capacidad de unirse a

las Proteínas Ligadoras de Penicilina o (PBP); la producción de estas enzimas puede ser constitutiva o inducida (2).

La resistencia a antibióticos betalactámicos puede atribuirse a diferentes mecanismos como, disminución de la permeabilidad del antibiótico por alteración de porinas presentes en la membrana celular de la bacteria, modificación química del sitio de acción del antibiótico como la alteración de las PBP y el fenómeno de tolerancia (2-4). Sin embargo, el mecanismo más frecuente e importante desde el punto de vista terapéutico en bacilos Gram negativos, es la resistencia bioquímica debida principalmente a la producción de enzimas betalactamasas (4;5).

Las betalactamasas de espectro expandido (BLEE), son enzimas derivadas por mutaciones de las betalactamasas clásicas del grupo 2b de la clasificación de Bush (6); se encuentran codificadas en plásmidos conjugativos, lo cual facilita su diseminación, no sólo entre distintas cepas de la misma especie, sino también entre bacterias de distintos géneros y grupos. Además de su codificación plasmídica, las BLEE forman parte frecuentemente de transposones o integrones lo cual determina su asociación con otros determinantes genéticos de resistencia transferibles, como los que confieren resistencia a los aminoglicósidos o al cotrimoxazol (7). Los diferentes tipos de BLEE confieren un grado de resistencia muy variable, la intensidad de hidrólisis de un determinado antibiótico difiere según las cepas consideradas, pudiendo incluso no tener efecto fenotípicamente detectable en algunos casos en los que únicamente tiene lugar un aumento de la concentración inhibitoria mínima (CIM), permaneciendo en el intervalo de sensibilidad (8;9).

El primer aislamiento de BLEE se obtuvo a partir de una cepa de *K. ozaenae*, y recibió el nombre de SHV-2. De forma práctica-

mente simultánea se describieron las Cefotaximasas, aisladas de una cepa de *E. coli* y *Salmonella* sp; este tipo de enzima en particular, se encuentra fundamentalmente en cepas de *S. enterica*, *S. thyphimurium* y *E. coli*, en otras enterobacterias como, *K. pneumoniae* y *P. mirabilis*, y en otros Gram negativos como *A. baumannii*, *A. hydrophila* y *V. cholerae*.

La prevalencia de cepas productoras de BLEE no ha cesado de aumentar en una amplia gama de bacterias Gram positivas y Gram negativas, dentro de estas últimas, muchas especies pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, especialmente *K. pneumoniae* y *E. coli*, que son responsables de infecciones nosocomiales graves, habitualmente en pacientes críticos; aunque naturalmente pueden producirse también infecciones de menor gravedad (10).

El perfil de multiresistencia antibiótica que expresan estas cepas ocasiona, especialmente, en el ámbito hospitalario, un problema terapéutico de notables dimensiones, ya que las BLEE confieren resistencia a las cefalosporinas de tercera generación y al aztreonam (11) y las cepas con estas enzimas, con frecuencia expresan también resistencia a otros grupos de antimicrobianos, incluidos los aminoglucósidos, quinolonas y cotrimoxazol (7). Los genes que codifican las BLEE y los que codifican la resistencia a otros antimicrobianos, pueden residir en el mismo plásmido conjugativo y se transmiten juntos de un microorganismo a otro, confiriendo el perfil de resistencia antibiótica múltiple. Esto permite la amplia distribución de la resistencia a los antibióticos y afecta seriamente los tratamientos.

Actualmente, diversas investigaciones han demostrado que un (38,80%) de *K. pneumoniae* y un (19,23%) de *E. coli* son productoras de BLEE (8;9;12;13). Sin embargo son pocos los datos que permiten conocer la

frecuencia de otras enterobacterias productoras de BLEE en la ciudad de Maracaibo, por este motivo se inició un estudio cuyo objetivo fue determinar la producción de BLEE de la familia *Enterobacteriaceae* aisladas en el CRB-SAHUM, durante el periodo Enero 2006 - Diciembre 2007.

Material y Método

Se realizó la determinación de BLEE a 3883 enterobacterias aisladas de los cultivos procesados en el CRB-SAHUM durante Enero 2006 – Diciembre 2007. Para la detección de BLEE se utilizaron los siguientes métodos; aproximación del doble disco (8;12;14-17), el método del disco combinado (12;17-20), y el método E-Test ESBL (AB-Biodisk) (12;20;21).

A todas las cepas incluidas en la investigación se les realizaron pruebas de susceptibilidad mediante el método de Baüer-Kirby (22), siguiendo los lineamientos del CLSI (17;23). La selección inicial de las cepas productoras de BLEE se realizó mediante los criterios del CLSI (17), para ello se utilizaron discos de cefpodoxima (CPD) de 10µg; ceftazidima (CAZ) 30 µg; aztreonam (ATM) 30µg; ceftriaxona (CRO) 30µg y cefotaxima (CTX) 30 µg; si el resultado del antibiograma indicaba un halo de inhibición ≤ 17 mm para CPD; ≤ 22 para CAZ; ≤ 27 para ATM; ≤ 25 para CRO o ≤ 27 para CTX, se consideraba a la cepa probable productora de BLEE (17). A toda cepa sospechosa de producir BLEE se le confirmó la producción mediante el método del doble disco, E-test y disco combinado.

Para el método de sinergia del doble disco (24), se utilizó una placa de Agar Mueller Hinton (MH) y se inoculó con una suspensión bacteriana preparada de igual manera que en el método de difusión del disco en agar, sobre esta se colocaron discos de CTX, CAZ, CRO, CPD y ATM a 20 mm de centro a

centro de un disco central de amoxicilina/ácido clavulánico (AMC), esta placa se incubó a 35°C + 1°C por 18-24h, posteriormente se realizó la lectura y una zona de inhibición agrandada o distorsionada alrededor del disco de (AMC) indicativo de sinergia entre el ácido clavulánico y cualquiera de los cuatro antibióticos probados, fue tomado como evidencia de producción de BLEE (20;24).

Para el método del disco combinado (19) se utilizaron discos de papel de filtro impregnados con CAZ (30µg) y CTX (30µg) y un inhibidor suicida de betalactamasas, como el ácido clavulánico (10µg). La confirmación o no de la producción de BLEE, se realiza midiendo el diámetro de inhibición producido en este disco, el cual debería ser superior a 5mm o más, en comparación con el halo de inhibición mostrado por el microorganismo cuando el antimicrobiano es usado individualmente (sin la adición de ácido clavulánico) (8;19).

Para el método de E-Test (AB-Biodisk), se utilizaron tiras de material no poroso que contienen el antimicrobiano en estudio y su combinación con ácido clavulánico en un gradiente decreciente de concentración; para este método, se preparó un inóculo estandarizado igual al utilizado en el método de difusión del disco en agar y se inocularon las placas de agar Mueller Hinton. Seguidamente, se procedió a colocar dos tiras de E-Test ESBL; una con la combinación de CAZ y CAZ/ácido clavulánico con rangos de CIM de 32-0,50 µg/ml y de 4-0,064 µg/ml respectivamente; mientras que la otra contenía CTX y CTX/ácido clavulánico con rango de 16-0,25 µg/ml y 1-0,016 µg/ml. La CIM estuvo determinada en el punto donde la elipse de inhibición del crecimiento intercepta la escala de la tira. Para confirmar la producción de BLEE, se obtuvo la razón de dividir la CIM del antimicrobiano solo, entre la CIM

del antimicrobiano combinado con el Acido Clavulánico; si esta razón es mayor o igual a 8, se confirma la producción de BLEE (8;18).

Para el control de calidad de las pruebas de susceptibilidad se utilizaron las siguientes cepas de *E. coli* ATCC 35218, ATCC 25922; además se utilizó una cepa *K. pneumoniae* CRB-2544R, BLEE positiva.

Para la determinación de los porcentajes de resistencia y sensibilidad; así como los perfiles de susceptibilidad antimicrobiana, los resultados de los antibiogramas y otras pruebas de susceptibilidad, se utilizó el programa WHONET (World Health Organization. Net. Versión 5.4). Para el análisis estadístico de los resultados se realizaron pruebas de independencia, utilizando para ello como estadístico de prueba el Chi-Cuadrado (X^2) de Pearson, con un nivel de significancia de 95% ($\alpha = 0.05$), utilizando el programa SPSS® para Windows (versión 11.0).

Resultados

Se analizaron un total de 3883 cepas bacterianas, pertenecientes a la Familia *Enterobacteriaceae*. Las cepas estuvieron distribuidas de la siguiente manera: 1761 cepas de *E. coli* (45,35%), 970 *K. pneumoniae* (24,99%), 447 *E. cloacae* (11,51%), 277 *P. mirabilis* (7,13%), 158 *M. morgani* (4,06%), 60 *K. oxytoca* (1,54%), 43 *E. aerogenes* (1,10), 38 *C. freundii* (0,99%), 34 *P. vulgaris* (0,88%), 28 *S. marcescens* (0,72%), 27 *P. stuartii* (0,70%), 21 *E. agglomerans* (0,54%), 10 *P. penneri* (0,26%) y 9 *C. koseri* (0,23%).

De las 3883 cepas estudiadas, se pudo confirmar la producción de BLEE en 951 (24,49%) cepas de enterobacterias, mientras que en las 2932 cepas restantes, no se encontró evidencia de producción de BLEE.

Al distribuir por género y especie, las cepas BLEE positivas, pudo observarse que las

mismas estaban conformadas por: 389/970 *K. pneumoniae* (40,10%); 324/1761 *E. coli* (18,34%); 141/447 *E. cloacae* (31,54%); 26/60 *K. oxytoca* (43,33%); 19/277 *P. mirabilis* (6,86%); 15/158 *M. morgani* (9,49%); 13/43 *E. aerogenes* (30,23%); 8/38 *C. freundii* (21,05%); 7/28 *S. marcescens* (25,00%); 3/34 *P. vulgaris* (8,82%); 3/27 *P. stuartii* (11,11%) y 3/21 *E. agglomerans* (14,29%). No se detectó producción de BLEE en cepas de *P. penneri* y *C. koseri*.

La Tabla 1 muestra la distribución de las cepas y el porcentaje de producción de BLEE, de acuerdo a la procedencia o reclusión del paciente, se observa que el mayor número de cepas positivas proviene de las unidades de cuidados intensivos (37,42%), seguido de los pacientes hospitalizados (33,47%) y el porcentaje más bajo se encontró en los pacientes ambulatorios y de consulta externa (18,10%).

Discusión

Las infecciones causadas por bacterias productoras de Betalactamasas representan un reto para el equipo de salud; aún se desconoce la prevalencia real de las BLEE en la mayoría de las instituciones de salud; pero los frecuentes fracasos terapéuticos en las infecciones por enterobacterias han dirigido los estudios, hacia los mecanismos de resistencia de dichos microorganismos, ya que este grupo de bacterias es el que más mecanismos de resistencia a betalactámicos ha desarrollado.

En la presente investigación se analizaron un total de 3883 cepas bacterianas pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, conformadas por 14 especies diferentes, donde se pudo confirmar la producción de BLEE en un total de 951 cepas, que constituyen el 24,49%; mientras que en las 2932 cepas restantes (75,51%), no se encontró evidencia de producción de BLEE. Al comparar los por-

Tabla 1. Distribución según Localización y Producción de BLEE en las Cepas de Enterobacterias.

| Microorganismo | UCI | | | | | | Hosp | | | | | | C. Ext | | | | | | Totales | | | | | |
|--|------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|-------------|--------------|------------|--------------|-------------|--------------|--------|---|---------|---|--------|---|--------|---|
| | BLEE + | | BLEE - | | BLEE + | | BLEE - | | BLEE + | | BLEE - | | BLEE + | | BLEE - | | BLEE + | | BLEE - | | BLEE + | | BLEE - | |
| | N° | % | N° | % | N° | % | N° | % | N° | % | N° | % | N° | % | N° | % |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 61 | 45,19 | 73 | 54,07 | 191 | 45,91 | 225 | 54,09 | 137 | 32,70 | 282 | 67,30 | 389 | 40,10 | 580 | 59,79 | | | | | | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | 35 | 38,89 | 54 | 60,00 | 111 | 27,34 | 295 | 72,66 | 177 | 13,99 | 1088 | 86,01 | 324 | 18,34 | 1437 | 81,60 | | | | | | | | |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 10 | 25,00 | 30 | 75,00 | 72 | 37,31 | 121 | 62,69 | 59 | 27,57 | 155 | 72,43 | 141 | 31,54 | 306 | 68,46 | | | | | | | | |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 0 | 0,00 | 15 | 100,00 | 10 | 13,16 | 66 | 86,84 | 9 | 4,84 | 177 | 95,16 | 19 | 6,86 | 258 | 93,14 | | | | | | | | |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | 4 | 57,14 | 3 | 42,86 | 3 | 27,27 | 8 | 72,73 | 6 | 24,00 | 19 | 76,00 | 13 | 30,23 | 30 | 69,77 | | | | | | | | |
| <i>Morganella morganii</i> | 1 | 16,67 | 5 | 83,33 | 10 | 25,64 | 29 | 74,36 | 4 | 3,54 | 109 | 96,46 | 15 | 9,49 | 143 | 90,51 | | | | | | | | |
| <i>Serratia marcescens</i> | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 2 | 33,33 | 4 | 66,67 | 5 | 22,73 | 17 | 77,27 | 7 | 25,00 | 21 | 75,00 | | | | | | | | |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | 2 | 40,00 | 3 | 60,00 | 6 | 30,00 | 14 | 70,00 | 18 | 51,43 | 17 | 48,57 | 26 | 43,33 | 34 | 56,67 | | | | | | | | |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 0 | 0,00 | 1 | 100,00 | 1 | 5,88 | 16 | 94,12 | 7 | 35,00 | 13 | 65,00 | 8 | 21,05 | 30 | 78,95 | | | | | | | | |
| <i>Citrobacter koseri</i> (<i>diversus</i>) | 0 | 0,00 | 1 | 100,00 | 0 | 0,00 | 2 | 100,00 | 0 | 0,00 | 6 | 100,00 | 0 | 0,00 | 9 | 100,00 | | | | | | | | |
| <i>Enterobacter agglomerans</i> | 0 | 0,00 | 1 | 100,00 | 1 | 12,50 | 7 | 87,50 | 2 | 16,67 | 10 | 83,33 | 3 | 14,29 | 18 | 85,71 | | | | | | | | |
| <i>Providencia stuartii</i> | 0 | 0,00 | 1 | 100,00 | 2 | 14,29 | 12 | 85,71 | 1 | 8,33 | 11 | 91,67 | 3 | 11,11 | 24 | 88,89 | | | | | | | | |
| <i>Proteus vulgaris</i> | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 2 | 12,50 | 14 | 87,50 | 1 | 5,56 | 17 | 94,44 | 3 | 8,82 | 31 | 91,18 | | | | | | | | |
| <i>Proteus penneri</i> | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 0 | 0,00 | 4 | 100,00 | 0 | 0,00 | 6 | 100,00 | 0 | 0,00 | 10 | 100,00 | | | | | | | | |
| Totales | 113 | 37,42 | 187 | 61,92 | 411 | 33,47 | 817 | 66,53 | 426 | 18,10 | 1927 | 81,90 | 951 | 24,47 | 2931 | 75,48 | | | | | | | | |

centajes obtenidos en esta investigación con los reportados en el estudio de Rubio y col. (25), se pueden observar valores similares de producción de BLEE, ya que de las cepas estudiadas un 24,49% resultaron ser productoras de BLEE.

Para la detección de BLEE en todas las enterobacterias se utilizaron varios métodos, lo que favoreció a mejorar la sensibilidad y especificidad y resultó de gran utilidad, por el hecho de que determinadas cepas BLEE positivas puedan parecer sensibles *in vitro* a los betalactámicos, siendo en realidad resistentes debido a que pueden existir diferencias cuantitativas en la actividad hidrolítica de determinadas cepas BLEE sobre los sustratos (26), sobretodo en enterobacterias diferentes a *E. coli* y *K. pneumoniae*; de igual manera ciertas betalactamasas pueden no detectarse si el inóculo es muy elevado y/o si la producción de betalactamasa se asocia con otro mecanismo de resistencia, como hiperproducción de cefalosporinasa de Bush tipo 1 (no se produce inhibición por ácido clavulánico) o una disminución de la permeabilidad de la membrana al paso del antibiótico (27;28).

Diversos estudios demuestran que *K. pneumoniae* es la enterobacteria productora de BLEE por excelencia, probablemente esto se deba al hecho de que ésta especie forma parte de la flora normal, sobrevive durante un tiempo sobre la piel y los fomites, y adquiere con cierta facilidad plásmidos conjugativos (25;29). No obstante, en el estudio realizado por Martínez y col. (30) el mayor porcentaje de producción de BLEE se presentó en *Enterobacter spp* (61%) y no en *K. pneumoniae* (46%), por lo que esta especie pudiese representar el principal reservorio de aislamientos entéricos productores de BLEE, en oposición a lo que se reporta frecuentemente en las investigaciones, de allí la importancia de incorporar a las otras en-

terobacterias en el estudio de producción de BLEE.

Por otra parte, un estudio realizado por Torres y col. (31), muestra resultados similares a los encontrados en esta investigación, ya que reportan 46,4% de cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEE, seguido de 29,5% de cepas de *E. coli* y en tercer lugar 12,1% de cepas de *Enterobacter spp* productoras de BLEE. Estos estudios confirman que la distribución de cepas productoras de BLEE es una característica local de cada centro de salud.

Dos mecanismos de resistencia a betalactámicos de amplio espectro han sido reportados para *K. oxytoca*, a) la superproducción de una betalactamasa cromosómica que sufre una mutación en la región del gen promotor (32;33), y b) la producción de una BLEE plasmídica adquirida (34). El primer mecanismo confiere resistencia a la mayoría de las penicilinas y reduce la susceptibilidad de la mayoría de las cefalosporinas, pero no de las cefamicinas, perfil de resistencia muy parecido al de las cepas productoras de BLEE tradicionales como las del tipo TEM, SHV y CTX-M. Secuenciación del gen de la betalactamasa cromosomal de *K. oxytoca* muestra que puede ser dividida en dos grupos *blaOXY-1* y *blaOXY-2* (35), estos dos genes comparten un 89,7% de homología y confieren el mismo perfil de resistencia a betalactámicos. Estudios bioquímicos de la betalactamasa cromosómica purificada OXY-2, han demostrado que exhibe una actividad de espectro extendido (36), lo que conduce a su clasificación funcional en el grupo 2be de las betalactamasas de espectro extendido (6). Esto podría explicar el hecho de que la principal enterobacteria productora de BLEE es *K. oxytoca* (43,33%); este alto porcentaje podría deberse a la superposición de dos mecanismos diferentes como son la presencia de la betalactamasa cromosómica OXY con la mutación

descrita anteriormente producto de la alta presión selectiva ejercida dentro del ambiente hospitalario, y la adquisición de plásmidos de resistencia que codifican la producción de BLEE tradicionales como SHV, TEM y CTX-M. esto explicaría en parte porque este microorganismo se encuentra en el primer lugar en producción de BLEE; sin embargo, solo 23 de 60 cepas de *K. oxytoca* fueron productoras de BLEE, lo que indica que este microorganismo no representa un gran problema dentro de la institución de salud al compararlo con los aislados de *K. pneumoniae* 389 de 970; *E. coli* 324 de 1761 y *E. cloacae* 141 de 447, cuyos valores indican que estos sí se comportan como patógenos nosocomiales que se transmiten y diseminan dentro de la institución.

Al correlacionar la distribución de cepas productoras de BLEE de acuerdo a la procedencia del paciente (Tabla 1), se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa en los aislados de las UCI ($p < 0,05$), estos resultados se corresponden con los obtenidos en el año 2003 en la investigación de Rubio y col. (25) quienes resaltaron que el servicio con mayor porcentaje de cepas productoras de BLEE fue la UCI de adultos (63,63%); de igual manera en el Proyecto GEIHH 2000 (9), se observó que el mayor porcentaje de cepas BLEE positivas se encontraba en la UCI con (49%), seguida de medicina interna (45,5%), luego por pediatría (42,5%) y por último, otros servicios con 24%. En la mayoría de los estudios previos, las cepas BLEE positivas han sido aisladas principalmente del ambiente hospitalario y dentro de éste la UCI, lo que es comprensible, ya que entre los factores de riesgo que se estiman que pueden tener influencia en la infección de cepas BLEE positivas se encuentran: la duración de la hospitalización y la estancia en la UCI, la presencia de una enfermedad de base severa

y la gravedad del paciente, el uso prolongado de terapia antimicrobiana y procedimientos invasivos.

Como se demuestra en la presente investigación, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* y *E. cloacae* fueron los microorganismos con mayor porcentaje en producción de BLEE; sin embargo, el comportamiento de las otras enterobacterias demuestra de forma clara que la resistencia a los antibióticos betalactámicos no es problema exclusivamente de *K. pneumoniae* y *E. coli*, si no de la familia *Enterobacteriaceae* en general.

Hasta hace poco, se consideraba que los microorganismos productores de BLEE causantes de infecciones era un problema que se daba preferentemente en las instituciones hospitalarias; sin embargo en este estudio, una buena parte (18,10%) de los microorganismos BLEE positivos fueron aislados de pacientes ambulatorios; probablemente debido a que este grupo de microorganismos frecuentemente producen infecciones y están ampliamente distribuidas en la población, lo que facilita los procesos de recombinación y transferencia de material genético entre microorganismos; (37) lo que hace posible que, microorganismos como *E. coli* presenten una gran diversidad de patrones de resistencia; por el contrario, *K. pneumoniae* es uno de los patógenos nosocomiales prevalentes, no obstante; la alta prevalencia de un patógeno nosocomial resistente a un determinado fármaco podría motivar una respuesta refleja, restringir el uso de dicho fármaco (38) factor que pudiera ser conveniente.

No obstante, existen casos que confirman la disminución de brotes nosocomiales, debido a la combinación de las medidas de control y prevención, tales como: el aislamiento, asepsia y lavado de manos, aliados con una terapia enfocada a erradicar la cepa resistente, basada en un uso racional de los

antibióticos. Estas medidas han sido útiles, aunque no constituyen una solución definitiva, por lo que se requieren nuevas políticas en el uso y manejo de las profilaxis antibióticas, un mayor control en las prescripciones de antibióticos de amplio espectro y el planteamiento del manejo cíclico de antibióticos, así como el cambio de la terapia intravenosa a la oral tan pronto como sea posible (39). Aún así, se requiere de un monitoreo constante de los perfiles fenotípicos observados en el laboratorio, adicional al control permanente del uso de antimicrobianos. Estas conductas deben ser potencializadas por la presencia de programas de vigilancia de la resistencia tanto a nivel nacional como local y de aproximaciones multidisciplinarias para una adecuada terapia (39).

Es relevante acotar que hoy en día las Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) son el principal ambiente dentro del hospital, tanto de la colonización, como de los brotes epidémicos nosocomiales, y es especialmente relevante el problema en las unidades pediátricas. Desconocer su presencia puede llevar a utilizar antibióticos de poca eficiencia sobre estos microorganismos. En la actualidad, para este caso, el principal objetivo es la instauración de un protocolo común de vigilancia de la infección nosocomial en UCI, el cual será fundamental para conocer la evolución temporal de las tasas de incidencia de los microorganismos como por ejemplo, de los bacilos Gram negativos multiresistentes en dicha unidad (40).

Por otra parte, la resistencia antimicrobiana aparece junto a la introducción de los antimicrobianos para combatir las enfermedades infecciosas. En el transcurso de los años, el uso indiscriminado de antimicrobianos en el hombre ha transformado este fenómeno en un problema creciente, que involucra cada día mayor número de cepas, nuevas

especies y nuevos mecanismos. El estudio del comportamiento de las bacterias frente a los antimicrobianos *in vitro*, se hace hoy cada vez más importante ya que no se tiene capacidad de predecir la respuesta que ellas pudieran tener frente al antimicrobiano que se quiere prescribir para la terapia (41).

En consecuencia, es importante reflejar, que en la actualidad existen líneas de investigación cuyo objetivo principal es optimizar la caracterización y detección de cepas microbianas así como la utilización de pruebas sencillas que puedan implementarse en el laboratorio de microbiología y que permitan hacer predicciones en cuanto a la resistencia; esto con el fin de disminuir costos, hacer un uso racional de los recursos y brindar un mejor control de calidad en el laboratorio microbiológico. Ejemplo de ello son numerosos estudios que evalúan métodos confirmatorios para la detección de betalactamasas y otros que combinan el estudio de la resistencia con ciertos antimicrobianos e intentan predecir las posibles alternativas terapéuticas mediante el estudio de los patrones fenotípicos (39). Esto permite que desde el laboratorio de rutina, se puedan hacer mayores aproximaciones hacia un enfoque adecuado en el uso de los antibióticos, reduciendo la presión selectiva generada por ello. El conocimiento de la epidemiología local y regional, así como la naturaleza de la bacteria resistente ayudan a dirigir medidas conducentes al control y más aún, a la prevención de la diseminación de los aislados letales (39).

Las bacterias son particularmente eficientes en potenciar los efectos de la resistencia, no sólo por su habilidad de multiplicarse rápidamente; sino también, por su capacidad de transferir genes de resistencia a otras cepas o especies. Bacterias resistentes son capaces de diseminarse fácilmente entre la población, y particularmente, en ambientes

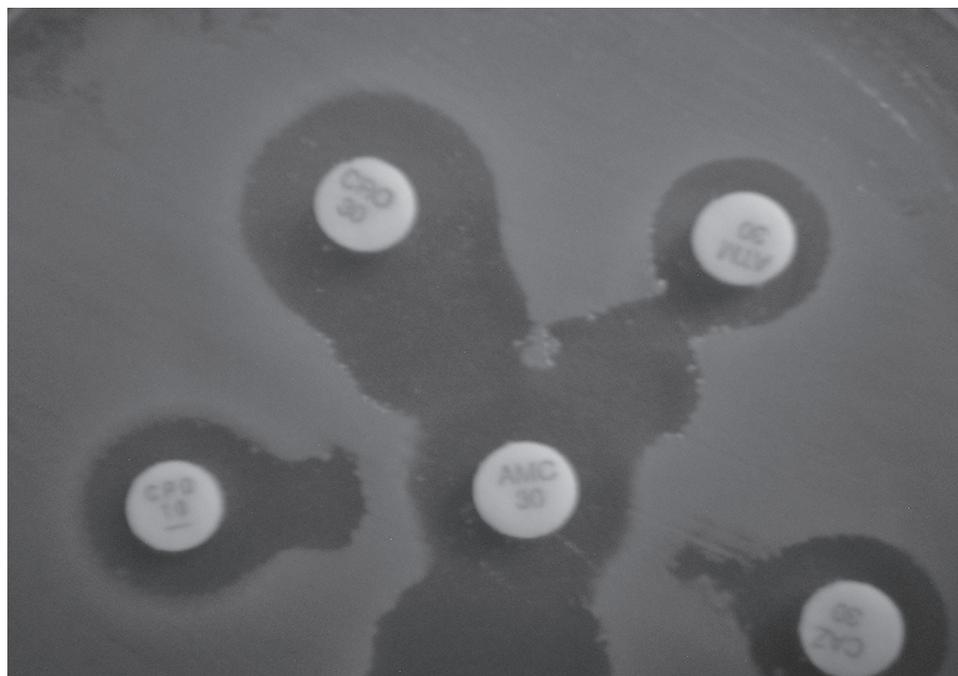


Figura 1. Método del doble disco, CAZ (ceftazidima), CRO (ceftriaxona), ATM (Aztreonam), CTX (Cefotaxima) y AMC (Amoxicilina/ácido clavulánico). La aparición de zonas de inhibición agrandadas o distorsionadas alrededor del disco de AMC, producto del efecto sinérgico inhibitorio de la betalactamasa por acción del clavulánico se considera positivo para la producción de BLEE.

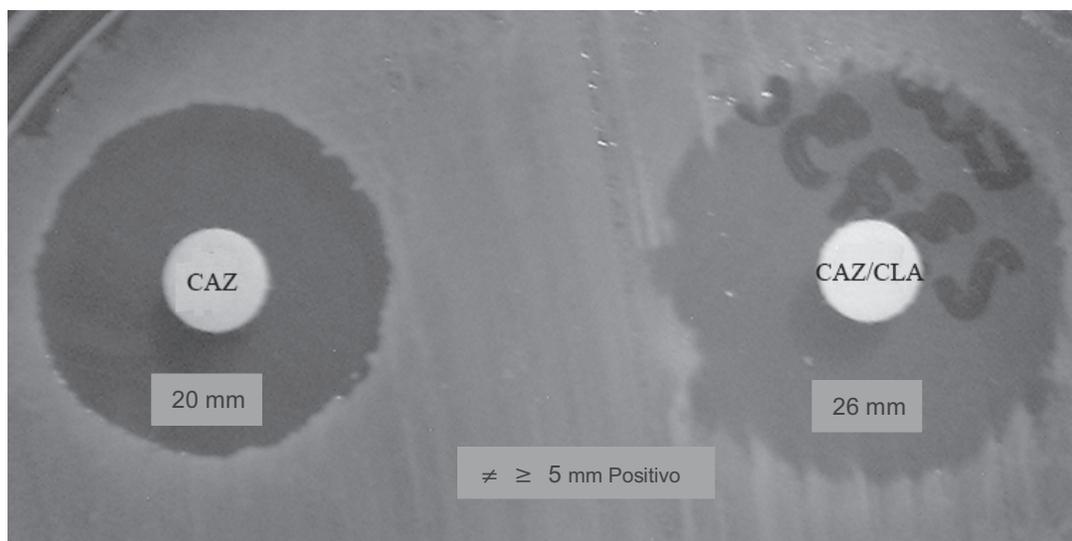


Figura 2. Método del disco combinado, CAZ (disco de ceftazidima) CAZ/CLA (disco de ceftazidima con ácido clavulánico), una diferencia en el tamaño del halo de inhibición mayor o igual a 5mm se considera confirmatoria para la producción de BLEE.

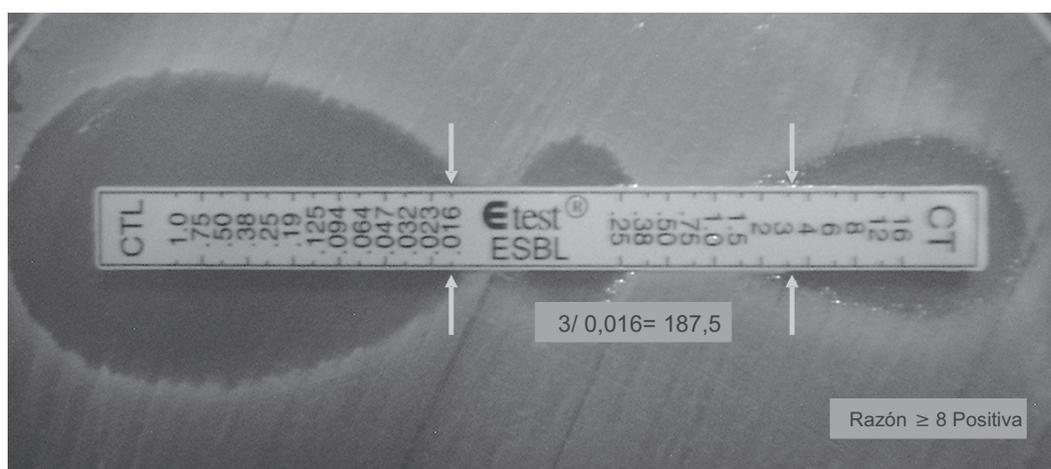


Figura 3. Método E-TEST ESBL, para confirmar la producción de BLEE se determina la razón entre las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de Cefotaxima (CT) y Cefotaxima/ácido clavulánico (CTL), si el producto es mayor de 8, se considera la prueba positiva para la producción de ESBL, también puede considerarse la prueba positiva cuando se observa la zona fantasma en el centro de la tira producto de la inhibición de la betalactamasa producida por el ácido clavulánico.

donde el uso masivo de antimicrobianos y la presencia de pacientes debilitados (hospitales), hacen que la diseminación sea un fenómeno común (41).

En la actualidad, las BLEE constituyen un problema terapéutico y epidemiológico, en el caso de las infecciones causadas por enterobacterias, ya que las bacterias productoras de este tipo de betalactamasas son resistentes a las penicilinas, las cefalosporinas y el aztreonam, y un 30% a 60% de ellas también a los betalactámicos asociados a inhibidores de betalactamasas; además, un porcentaje alto, por corresponsencia, son también resistentes a las quinolonas, los aminoglucósidos, las tetraciclinas y el cotrimoxazol (42).

Referencias Bibliográficas

- (1) Forero J. Betalactamasa de Espectro Extendido en Pediatría. *Pediatría* 2002 37(4): 12-15.
- (2) Washington JA. Functions and activities of the Area Committee on Microbiology of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clin Microbiol Rev* 1991;4(2): 150-155.
- (3) Finch RG. Antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 1998 (2):125-8.
- (4) Hart CA. Antibiotic resistance: an increasing problem? *BMJ* 1998 25;316(7140): 1255-6.
- (5) Acar JF, Goldstein FW. Consequences of increasing resistance to antimicrobial agents. *Clin Infect Dis* 1998 ;27 Suppl 1:S125-S130
- (6) Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(6):1211-33.
- (7) Bush K, Miller GH. Bacterial enzymatic resistance: β -lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes. *Current Opinion in Microbiology* 1998; 1(5):509-515.
- (8) Camacho L, Perozo-Mena A, Castellano-González M, Bermúdez E, Haris B. Métodos fenotípicos para la detección de betalactamasas de espectro extendido en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2003; 24:98-103.

- (9) Hernandez JR, Pascual A, Canton R, Martinez-Martinez L. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in spanish hospitals (GEIH-BLEE Project 2002). *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2003;21(2):77-82.
- (10) Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997;24 Suppl 1:S19-S45.
- (11) García P. Resistencia Bacteriana en Chile. *Revista Chilena de Infectología* 2008;20(1): S11-S23.
- (12) Perozo-Mena A, Castellano-González M, Ginestre-Pérez M, Rincón-Villalobos G, Harris-Reyes B. Caracterización Molecular y Detección de Betalactamasas de Espectro Extendido en Cepas de *E. coli* y *K. pneumoniae* Aisladas en unidades de Cuidados Intensivos de un Hospital Universitario. *Kasmera* 2008; 35(2):89-106.
- (13) Sandra-Toledo L, Paz-Montes A, Piña-Reyes E, Perozo-Mena A. Enterobacterias Productoras de B-Lactamasas de Espectro Extendido Aisladas de Hemocultivos en un Hospital Universitario. *Kasmera* 2008; 35(1): 15-25.
- (14) Instituto Nacional De Higiene Rafael Rangel, Ministerio de Salud y Desarrollo Social. II Curso de actualización en la Resistencia a los Antimicrobianos y XVI Curso latinoamericano de Actualización Antimicrobiana. 2005. Caracas Venezuela.
- (15) Livermore DM, Brown DFJ. Detection of β -lactamase-mediated resistance. *J Antimicrob Chemother* 2001;48 (suppl 1): 59-64.
- (16) Carretto E, Barbarini D, Capra F, Bolongaro A, Braschi A, Marone P. Extended spectrum B-lactamase-producing Enterobacteria in an Italian intensive Care Unit Clinical and Therapeutics remarks. *Journal of Chemotherapy* 2004;16(2):145-150.
- (17) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eighteenth Informational Supplement. M100 S18. 2008.
- (18) Dos Santos A, Rodrigues J, Bronharo M, Silva H. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido. *Jornal Brasileiro do Patologia e Medicina Laboratorial* 2003;39(4):301-8.
- (19) Carter MW, Oakton KJ, Warner M, Livermore DM. Detection of Extended-Spectrum beta -Lactamases in *Klebsiellae* with the Oxoid Combination Disk Method. *J Clin Microbiol* 2000; 38(11):4228-32.
- (20) Peixoto A, Pires D, Da Silva F, Barth L. Extended-spectrum beta-lactamase in *Klebsiella spp* and *Escherichia coli* obtained in a Brazilian teaching hospital; Detection, prevalence and molecular typing. *Brazilian Journal of Microbiology* 2003;34:344-8.
- (21) Spanu T, Luzzaro F, Perilli M, Amicosante G, Toniolo A, Fadda G. Occurrence of Extended-Spectrum β -Lactamases in Members of the Family *Enterobacteriaceae* in Italy: Implications for Resistance to β -Lactams and Other Antimicrobial Drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(1): 196-202.
- (22) Bauer A, Kirby W, Sherris J, Turck M. Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45:493-6.
- (23) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test: Approved Standards Ninth Edition. 2006.
- (24) Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; 10(4):867-78.
- (25) Rubio A, Calderas A, Trujillo B. Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) en cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* aisladas de muestras del Servicio Autónomo Hospital Universitario de Maracaibo 2003. Tesis de Grado para optar al Título de Licenciado en Bioanálisis. Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. Pp 145.
- (26) Lee K, Lim JK, Yong D, Yum J, Chong Y, Okamoto R, et al. Evaluation of Efficiency of Screening Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Hospitals Where the Bacteria

- Are Increasingly Prevalent. *J Clin Microbiol* 2001;39(10):3696-9.
- (27) Livermore DM. β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995;8(4):557-84.
- (28) Lewis E, Winterberg K, Fink A. A point mutation leads to altered product specificity in β -lactamase catalysis. *PNAS* 1997; 94(2): 443-7.
- (29) Krontal S, Leibovitz E, Greenwald-Maimon M, Fraser D, Dagan R. *Klebsiella* bacteremia in children in southern Israel (1988-1997). *Infection* 2002;30(3):125-31.
- (30) Martínez P, Mercado M, Máttar S. Determinación de beta-lactamasas de espectro extendido en gérmenes nosocomiales del Hospital San Jerónimo, Montería. *Colombia Médica* 2003;34(4):196-205.
- (31) Torres L, Gagliotta V, Torres O, Benítez M, Domínguez M, Pedroza R. Betalactamasas de espectro extendido en Enterobacterias aisladas en centros de salud de Caracas. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2006;26(2):80-8.
- (32) Mammeri H, Poirel L, Nordmann P. In Vivo Selection of a Chromosomally Encoded β -Lactamase Variant Conferring Ceftazidime Resistance in *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(12):3739-42.
- (33) Fournier B, Lu CY, Lagrange PH, Krishnamoorthy R, Philippon A. Point mutation in the *pribnow* box, the molecular basis of beta-lactamase overproduction in *Klebsiella oxytoca*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39(6):1365-8.
- (34) Venezia R, Scarano F, Preston K, Steele L, Root T, Limberger R, et al. Molecular epidemiology of an SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in *Enterobacteriaceae* isolated from infants in a neonatal intensive care unit. *Clin Infect Dis* 2005;21:915-23.
- (35) Fournier B, Roy PH, Lagrange PH, Philippon A. Chromosomal beta-lactamase genes of *Klebsiella oxytoca* are divided into two main groups, *bla*OXY-1 and *bla*OXY-2. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40(2): 454-9.
- (36) Arakawa Y, Ohta M, Kido N, Mori M, Ito H, Komatsu T, et al. Chromosomal beta-lactamase of *Klebsiella oxytoca*, a new class A enzyme that hydrolyzes broad-spectrum beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33(1):63-70.
- (37) Ramos Godínez A, Hernández Pedroso W, Nodarse Hernández R, Padrón Sánchez A, De Armas Alonso E, Del Rosario Cruz L. Detección precoz de enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido en pacientes graves. *Rev Cub Med Int Emerg* 2006;5(1):294-301.
- (38) Bermejo J, Bencomo B, Arnesi N, Lesnaberes P, Borda N, Notario R. Alta correlación entre el consumo de ciprofloxacina y la prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* productora de productora de betalactamasa de espectro extendido. *Rev Chil Infect* 2006; 23(4):316-20.
- (39) Crespo M. La lectura interpretativa del antibiograma: Una herramienta para predecir la resistencia bacteriana en el laboratorio de microbiología de rutina. *Colombia Médica* 2002;33(4):179-93.
- (40) Hernández Pedroso W, Ramos Godínez A, Nodarse Hernández R, Padrón Sánchez A, De Armas Moreno A. Resistencia bacteriana en las bacterias productoras de betalactamasas extendidas (BLEE). *Rev Cub Med Int Emerg* 2006; 5(1):256-64.
- (41) Trucco O, Prado V, Duran, Y, y grupo PRONARES. Red de vigilancia de resistencia antimicrobiana PRONARES. *Rev Chil Infect* 2002; 19(Suppl 2):s140-s148.
- (42) Gobernado M. Betalactamasas de espectro extendido en aumento. Servicio de Microbiología Hospital Universitario La Fe, Valencia. *Rev Esp Quim*, 2005; 18(2):115-7.